

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

«___» _____ 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Синтез бактериальной целлюлозы глубинной культурой уксуснокислых
бактерий *Komagataeibacter xylinus* B-12068 в ферментере

Руководитель

подпись, дата

доцент, к.т.н.

должность, учёная степень

Е. Г. Киселев

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

В. П. Романюк

инициалы, фамилия

Красноярск 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. Литературный обзор.....	5
1.1. Бактериальная целлюлоза.....	5
1.2. Характеристика бактериальной целлюлозы	6
1.3. Получение бактериальной целлюлозы	7
1.4. Штаммы производства бактериальной целлюлозы	8
1.5. Ферментационные среды производства БК.....	9
1.6. Условия культивирования продукции БК	11
1.7. Типы ферментеров.....	12
2. Материалы и методы.....	13
2.1. Объект исследования.....	13
2.2. Оборудование.....	13
2.3 Методы исследования.....	14
2.3.1 Биосинтез БЦ.....	14
2.3.2 Биосинтез БЦ на шейкере в инкубаторе.....	15
2.3.3 Получение инокулята.....	15
2.3.4 Приготовление стерильного раствора глюкозы	15
2.3.5 Измерение концентрации глюкозы	16
2.3.6 Получение сухого материала	17
2.3.7. Расчет продуктивности	17
3. Результаты	18
3.1. Влияние разных условий перемешивания на выход БЦ.....	18
3.1.1. Изучение процесса синтеза БЦ в шейкере-инкубаторе	18
3.1.2. Влияние оборотов мешалки ферментера на выход целлюлозы....	19
3.2. Изучение процесса синтеза БЦ в условиях подвода энергии к газовой фазе	21
3.3. Изучение процесса синтеза БЦ в условиях комбинированного подвода энергии	23
ВЫВОДЫ.....	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	39

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная целлюлоза (БЦ) — это уникальный природный материал, обладающий многочисленными свойствами, которые делают его чрезвычайно ценным для различных применений, таких как промышленность и биомедицина. Главной особенностью БЦ является его химическая чистота; в отличие от растительной целлюлозы, БЦ не связана с остаточными гемицеллюлозами, пектином, лигнином. Кроме того, это волокнистый материал с желеобразной структурой, высокой пористостью, проницаемостью. Все это дает толчок для изучения свойств БЦ, поиск оптимальных условий для синтеза, определение оптимального состава среды.

Самым распространенным органическим веществом на Земле является растительная целлюлоза (РЦ). Из неё производят хлопок, добавки для лаков, волокна вискозы для производства тканей, целлофан и другие пластические материалы, и бумагу[1].

Целлюлоза является одним из самых распространенных биополимеров на земле и чаще всего производится из растений. Это приводит к истощению лесных ресурсов, в результате чего начинаются проблемы с окружающей средой. Кроме того, постоянно растущая индустриализация оказала крайне негативное давление на тонкий экологический баланс растительного мира. Поэтому для нас крайне важен поиск альтернативы для РЦ. Растительная целлюлоза и бактериальная целлюлоза химически одинаковы, β -1,4-глюканы имеют ту же молекулярную формулу $(C_6H_{12}O_6)_n$, но их физические особенности разные — БЦ обладает уникальными свойствами, которые отсутствуют в целлюлозе растительного происхождения [2].

Благодаря структуре БЦ, в состав которой входит только мономер глюкозы, она проявляет большее количество свойств: особая наноструктура, большая водоудерживающая способность, высокая степень полимеризации, высокая механическая прочность и высокая кристалличность. БЦ и ее производные обладают огромным потенциалом и обеспечивают

многообещающее будущее в различных областях, особенно в области медицины, где может БЦ использоваться как искусственная кожа, для изготовления перевязочных материалов, искусственных кровеносных сосудов[3].

Цель работы: Изучение условий синтеза бактериальной целлюлозы (БЦ) штаммом уксуснокислых бактерий *Komagataebacter xylinus* В-12068 при глубинном культивировании в ферментере с комбинированным подводом энергии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние механического перемешивания на синтез БЦ.
2. Изучить процесс синтеза БЦ с подводом энергии к газовой фазе.
3. Исследовать процесс синтеза БЦ в условиях комбинированного подвода энергии.
4. Оценить продуктивность синтеза БЦ штаммом *Komagataebacter xylinus* В-12068 в условиях глубинного культивирования.

Объект исследования.

Процесс культивирования штамма *Komagataebacter xylinus* В-12068, синтезирующий бактериальную целлюлозу, выделенный на базовой кафедре биотехнологии СФУ.

1. Литературный обзор

1.1. Бактериальная целлюлоза

БЦ – экстрацеллюлярный линейный неразветвленный гомополимер, в состав которого входят мономеры глюкозы, соединенных 1,4-β-гликозидными связями. Бактериальная целлюлоза впервые описана А. Брауном в 1886 г. как «вид влажной кожи, опухшей, желатиновой и скользкой», которая покрывала поверхность среды с глюкозой, внеклеточный продукт бактерий, в том числе *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Komagataeibacter* (ранее *Gluconacetobacter*), *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Dickeya*. В 1931 году Дж. Барша и Х. Хибберт проанализировали химический состав и структурные свойства БЦ, и обнаружили, что БЦ была идентична целлюлозе растительного происхождения, имея схожую молекулярную формулу, но обладает уникальными свойствами по сравнению с целлюлозой растительного происхождения [4]. Бактериальная целлюлоза привлекла большое внимание во второй половине 20 века.

Acetobacter – наиболее ранний штамм, используемый для синтеза БЦ. Позже было установлено, что БЦ может также вырабатываться в таких бактериях, как *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* и *Escherichia*.

Среди них *Acetobacter xylinus* (или *Gluconacetobacter xylinus*, *Komagataeibacter xylinus*) в настоящее время считается штаммом с самой сильной способностью синтезировать целлюлозу.

Биосинтез бактериальной целлюлозы представляет собой полимеризацию УДФ-глюкозы в α-1,4-глюкановые цепи путем взаимодействия различных ферментов, а затем образуются микроволокна, путем зачистки пор бактериального материала [5]. Есть три гидроксильные группы на каждом глюкозильном кольце БЦ, так что микроволокна самособираются в волокнистый пучок диаметром 10-100 нм за счет большого количества водородных связей, а затем образуют трехмерное нановолокно с большим количеством пор для получения нативной БЦ.

1.2. Характеристика бактериальной целлюлозы

По сравнению с растительной целлюлозой, бактериальная целлюлоза обладает более отличными свойствами. Например, бактериальная целлюлоза имеет высокую чистоту без лигнина, гемицеллюлозы и другие примесей. Поэтому процесс очищения очень прост. Более того, БЦ практически не имеет отторжения и воспалительной реакции при взаимодействии с живыми организмами, а также обладает превосходными свойствами:

- биосовместимость, которая является основной причиной ее исследований в области биомедицины;

- высокая степень полимеризации, например степень полимеризации *Acetobacter xylinus* целлюлозы может быть до 16000;

- кристалличность БЦ высока, вплоть до 95%, и сообщалось, что модуль Юнга моноволокну БЦ может достигать 114 ГПа [6].

Таким образом, благодаря механическим свойствам, множество статей, где описывается много сфер применения БЦ:

- пищевая упаковочная пленка;

- защитная пленка;

- лечение перфорации барабанной перепонки.

Высокая пористость и трехмерная структура являются большим преимуществом БЦ, поэтому она используется в чувствительных материалах и фотокатализаторах.

Между тем, БЦ широко используется в клеточной культуре и раневых повязках из-за своей хорошей проницаемости, гигроскопичности, емкости и гибкости.

Кроме того, БЦ обладает хорошей управляемостью и биodeградируемостью во время синтеза, что позволяет использовать ее в медицине. БЦ широко используется в каркасах для тканевой инженерии, препараты с контролируемым высвобождением и других исследованиях. Также

БЦ можно широко использовать в пищевой, декоративной промышленности, для изготовления конденсаторов, в биомедицинской и тканевой инженерии [7].

БЦ является неразветвленным длинноцепочечным полимером, который состоит из 1–4 β -гликозидных связанных единиц глюкозы. Ближний линейный глюкан цепочки образует высоко регулярные нанофибриллы поперечного сечения внутри- и межмолекулярными водородными связями [8]. Эти нанофибриллы могут собираться в микрофибриллы шириной 50–80 нм и толщиной 3–8 нм, образуя, таким образом, трехмерную сетевую структуру [9–10].

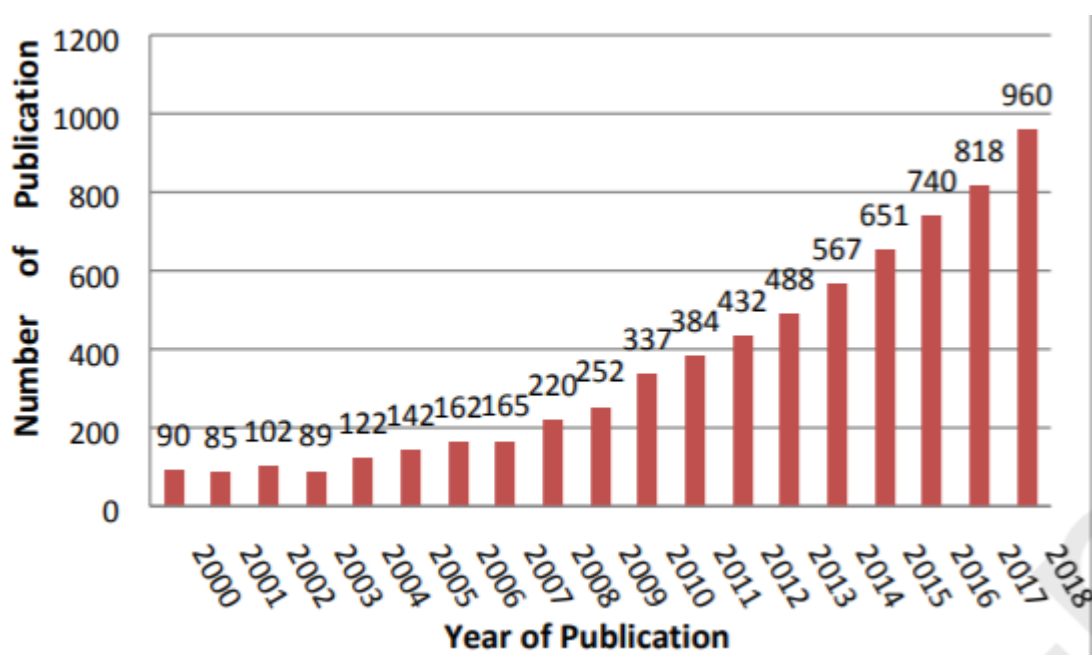


Рисунок 1 – Ежегодное количество публикаций о БЦ с 2000 года (поисковая система Web of Science TM, термин «бактериальная целлюлоза») [11].

На рисунке 1 мы видим десятикратное увеличение количества публикаций о БЦ за последние 18 лет, что говорит о повышении внимания специалистов различных областей к этому уникальному природному материалу.

1.3. Получение бактериальной целлюлозы

От разного назначения БЦ зависит и способ культивации бактерий, синтезирующих целлюлозу, от которых зависят основные свойства БЦ.

Основными являются 2 метода синтеза – стационарное и глубинное. Во время стационарного культивирования получают пленки бактериальной целлюлозы. Главным недостатком этого способа культивирования является увеличенная стоимость производства, т.к. используется ручной труд [12].

Синтез БЦ проводится при стационарных или глубинных условиях. В зависимости от них целлюлоза принимает разную форму. Процесс образования целлюлозы в статических условиях регулируется воздухом, а выход зависит от концентрации источника углерода. Увеличение времени роста увеличит образование БЦ наряду с водородной и С-Н связью. Во время глубинного культивирования бактериальная целлюлоза будет иметь вид сфер с отличным диаметром, также может быть в виде волокон. Данный способ культивирования является наиболее оптимальным для промышленного производства, т.к. есть возможность вести процесс в ферментерах, что позволяет максимально автоматизировать процесс и, соответственно, исключить ручной труд. Синтез бактериальной целлюлозы достигает своего пика, когда пленка начинает расти вниз и захватывать все бактерии. После этого они становятся неактивными, т.к. имеющегося количества кислорода им недостаточно. Синтез в стационарном состоянии увеличивает производительность бактериальной целлюлозы по сравнению с глубинным процессом. Несмотря на это, БЦ, полученная в перемешиваемой культуре, имеет микроструктурные изменения, а точнее, низкую степень полимеризации и низкий показатель кристалличности [13]. Помимо этого, у нее более низкий модуль упругости Юнга, более высокая водоудерживающая способность и более высокая вязкость суспензии в дезинтегрированной форме, чем у той, которая получена в статической культуре.

1.4. Штаммы производства бактериальной целлюлозы

БЦ может быть получена из многих бактерий, включая *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*,

Pseudomonas, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Dickeya* и *Rhodobacter* [14-18]. В дополнение к микробной продукции, БЦ также производится бесклеточной системой [19]. Среди этих бактерий вид *Gluconacetobacter*, описанный как новый род *Komagataeibacter*, широко используется в научных исследованиях и коммерческом производстве. Он используется в качестве модели из-за его более высокой производительности и способности потреблять различные источники углерода. Для повышения качества и урожайности была разработана технология генной инженерии, которая применяется для повышения эффективности производства БЦ. Buldum et al. разработал функциональную и стабильную систему продуцирования БЦ в генетически модифицированных (GM) *Escherichia coli* путем рекомбинантной экспрессии синтазных оперонов (bcsABCD) и восходящий оперон (сmсах, ссрАх) [20]. Генетическую трансформацию используют для производства *Komagataeibacter xylinus* [21]. Кроме того, пытаются генетически модифицировать некоторые штаммы, воздействуя на них ультрафиолетовым излучением, этилметансульфонатами, обработкой высоким гидростатическим давлением и нарушением целлюлозосинтазы, приводящее к появлению мутагенных штаммов [22–23].

1.5. Ферментационные среды производства БК

Выбор бактериальных источников не является исключительным фактором, который влияет на синтез БЦ, питательная среда также имеет решающее значение. Так как низкий выход и высокая стоимость производства БК являются важными недостатками, что ограничивает ее промышленное производство и более широкий спектр применений, стоит изучить более дешевые культуральные носители для производства БЦ.

В последнее время начинают использовать целлюлозные отходы из возобновляемых остатков агролесоводства или промышленных побочных продуктов в качестве источников углерода для повышения выхода БЦ, которые также могут снизить экономические издержки. К ним относятся пищевые

технологические отходы, гидролизованные гемицеллюлозы из отработанного щелока атмосферного варения уксусной кислоты, патока из свеклы и сахарного тростника, различные фруктовые отходы, порошок Конжака, рисовая кора, пшеничная солома, хлопчатобумажные отходы текстильной промышленности, кленовый сироп, кофе, вишневая шелуха[30].

Также производство БЦ может быть увеличено путем добавления в качестве индуктора карбоксиметилцеллюлозу, агар и ксантан, лигносульфонат и связанные с сахаром глюкуроновыкислотные олигосахариды, органические кислоты, этанол, никотинамид, ацетан, альгинат натрия и кальций.

Один из наиболее важных факторов, влияющих на выход, продуктивность и скорость синтеза БЦ – источник углерода, используемый для культивирования целлюлозосинтезирующих бактерий. Изучены многочисленные моно-, ди- и полисахариды, спирты (этанол, глицерин, этиленгликоль), органические кислоты (лимонная, глюконовая) и другие соединения (глюконо-лактон и ометил-глюкоза). Выявлено, что наиболее предпочтительными источниками углерода для производства БЦ являются D-арабит и D-маннит, которые показали в 6,2- и 3,8- кратное увеличение выхода БЦ, по сравнению с глюкозой. Выявлено, что по выходу БЦ сахара можно расположить в следующий ряд: сахароза > глюкоза > ксилоза > лактоза. Приведено сравнительное изучение влияния на биосинтез БЦ шести различных источников углерода, таких как глюкоза, глицерин, маннит, фруктоза, сахароза, галактоза [33]. Наиболее высокий выход БЦ обеспечивает сахароза, затем в порядке убывания следуют глицерин, маннит, глюкоза и фруктоза. Галактоза определена как наименее подходящий источник углерода. Маннит, фруктоза или глюкоза показали постоянные скорости образования. При добавлении сахарозы – низкий выход, это объясняется тем, что сахароза не может быть утилизирована напрямую. Микроскопические характеристики полученных из названных источников углерода образцов БЦ очень похожи. Все образцы имели близкую степень кристалличности. Несмотря на то, что глюкоза служит мономером в образовании БЦ и наиболее широко применяется в качестве

источника углерода для культивирования целлюлозосинтезирующих штаммов, её использование достаточно проблематично, так как параллельно с БЦ может накапливаться вторичный продукт – глюконовая кислота. Глюконовая кислота снижает уровень pH питательной среды, вследствие чего уменьшается выход целевого продукта. Из этого следует, что концентрация глюкозы – очень важный параметр. Высокая концентрация глюкозы в среде снижает выход БЦ, низкая концентрация глюкозы предпочтительнее для культивирования. При исследованиях, когда глицерин был источником углерода, результаты разделились. При статическом культивировании выход БЦ на глицериновых средах ниже, чем на глюкозных. Однако, при культивировании в динамических условиях выход БЦ на глицериновой среде повышался выше, чем на глюкозной среде. Использование мальтозы в качестве субстрата для культивирования БЦ приводит к снижению выхода БЦ в 10 раз по сравнению с глюкозой.

1.6. Условия культивирования продукции БК

Оптимизированное состояние культуры играет решающую роль в производстве. Условия ферментации штаммов, продуцирующих БЦ, обычно выполняются в статическом состоянии при температуре 26-30°C. Во время культивирования белая пленка появляется на поверхности среды, и ее толщина неуклонно увеличивается со временем культивирования. Во время процесса образования БЦ бактерии производят целлюлозу только вблизи поверхности, благодаря своим аэробным свойствам. Следовательно, производительность целлюлозы также зависит от площади поверхности культуры [34-35]. Альтернативное состояние культивирования выполняется в условиях встряхивания при примерно 150 об/мин для подачи большего количества воздуха для аэробных бактерий. Обычно в таком состоянии пленка БЦ больше не получается, а формируются сферы БЦ и увеличивается размер. По сравнению со статическим состоянием культуры это способ требует меньше рабочих сил. Однако, недостаток данных условий перемешивания

представляют собой высокую стоимость энергии. Поэтому для снижения стоимости производства БЦ были изобретены более подходящие и эффективные реакторы для культивирования. В производстве БЦ в перемешиваемых условиях, широко используются барботажный колонный биореактор, воздушно-подъемный реактор и модифицированный воздушно-подъемный реактор [36-38].

1.7. Типы ферментеров

Классификация ферментеров, которую чаще всего используют, описывает каким способом поступает энергия (по тому, как происходит аэрация и перемешивание).

- Ферментеры с подводом энергии к жидкой фазе

Чаще всего энергия поступает благодаря насосу, а жидкость попадает внутрь при помощи специализированного устройства.

- Ферментеры с подводом энергии к газовой фазе

Данные ферментеры характерны тем, что аэрация и перемешивание идет с помощью сжатого воздуха. Барботажные ферментеры относятся к данному типу. Устройство для барботирования находится в нижней части ферментера

- Ферментеры с комбинированным подводом энергии

Внутри данных ферментеров расположена механическая мешалка и барботер. Подвод энергии к газовой фазе осуществляется для того, чтобы происходила аэрация содержимого сосуда. Подача энергии к жидкой фазе происходит для перемешивания [40].

2. Материалы и методы

2.1. Объект исследования

В качестве продуцента бактериальной целлюлозы в исследованиях был использован штамм *Komagataebacter xylinus* В-12068, синтезирующий бактериальную целлюлозу выделенного на базовой кафедре биотехнологии СФУ.

2.2. Оборудование



Рисунок 2- Оборудование, используемое во время работы

На рисунке 2 отображено оборудование, используемое во время работы:

1. Шейкер инкубатор Incubator Shaker Innova® серии «New Brunswick Scientific».
2. Сушильный шкаф Memmert UF260 с принудительной конвекцией и регулировкой температуры.
3. Ламинарный бокс.
4. Спектрофотометр UNICO 2150.
5. Ферментер Bio Flo 115 (7,5л.), который оборудован гнездами для подключения датчика pH, растворённого кислорода, температуры, асептического пробоотбора. Присутствует пропорциональное интегральное управление нагревом и охлаждением, а также уровнем pH и растворённым кислородом. Система аэрации включает кольцевой барботер, сменный фильтр. Газовый поток регулируется с помощью расходомеров.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Биосинтез БЦ

Культивирование бактерий проводили в ферментере Bio Flo 115 (7,5 л.). Питательная среда содержит [9]:

- Дрожжевой экстракт- 5,0 г/л;
- Пептон- 5,0 г/л;
- Na_2PNO_4 – 2,7 г/л;
- Лимонная кислота- 1,15 г/л;
- Глюкоза- 20 г/л.

Условия культивирования:

- Температура- 30 °С;
- 3 л. среды
- Продолжительность- 7 дней;
- Скорость вращения платформы шейкера (оборотов в минуту)- 50, 100, 150, 200.

2.3.2 Биосинтез БЦ на шейкере в инкубаторе

Бактерии выращивали в условиях, разработанных для синтеза БЦ. Посевной материал получали в строго стерильных условиях путем ресуспендирования музейной культуры, хранящейся на скошенной агаризованной среде. В дальнейшем культуру выращивали в жидкой среде *Hestrin-Schramm* с концентрацией глюкозы 20 г/л (на 1 л. культуры). Инокулят получали в строго стерильных условиях в периодическом режиме с использованием шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) в стеклянных колбах объемом 2,0 л с коэффициентом заполнения 1/4 при 30 °С и 100, 150, 200 об/мин.

2.3.3 Получение инокулята

Музейную культуру *Komagataeibacter xylinus* В-12068, хранящуюся на скошенной агаризованной среде в холодильнике «Бирюса» (плюс 5 0С), смывают с поверхности среды (2 пробирки) в колбу КН-1-2000 с 500 мл. стерильной среды *Hestrin-Schramm*. Колбу закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой и размещают в шейкере инкубаторе Innova 44. Инкубирование проводится в течение 5 суток при температуре плюс 30±0,5 0С.

2.3.4 Приготовление стерильного раствора глюкозы

Раствор глюкозы готовить из расчёта 500 г/л. Для растворения глюкозы используют плитку электрическую с магнитным перемешиванием MR Hei-Standart Heidolph с температурой нагрева 60°С. В колбу на 1 литр заливают 500 мл. дистиллированной воды. Затем в колбу опускают магнит, ставят на плитку и засыпают 250 г глюкозы. После полного растворения глюкозы (около 1 часа), колбу закрыть крышкой и поставить на стерилизацию 0,5 атм., 115 °С, 25 мин.

2.3.5 Измерение концентрации глюкозы

Для измерения концентрации глюкозы необходимо 2 мл пробы центрифугировать до полного осаждения культуры. Далее 1 мл надосадочной жидкости развести в 4 мл дистиллированной воды.

В 3 пробирки внести вещества согласно таблице 1.

Таблица 1 – Пропись реагентов для определения концентрации глюкозы

1-ая пробирка	Опытная проба	40 мкл разбавленной надосадочной жидкости + 2 мл ФХС ¹
2-ая пробирка	Калибратор	40 мкл калибратора из набора «Глюкоза – ФКД» + 2 мл ФХС
3-ая пробирка	Холостая проба	40 мкл дистиллированной воды + 2 мл ФХС

Для приготовления ферментно-хромогенной смеси необходимо использовать набор «Глюкоза - ФКД». При приготовлении руководствоваться вложенной инструкцией в части «Приготовление рабочего раствора». Использовать колбу на 500 мл обёрнутой фольгой (для предотвращения попадания света) с крышкой. Смесь готова после полного растворения таблеток. Хранить готовую смесь в холодильнике. Хорошо встряхнуть пробирки через 5 минут после добавления ФХС и оставить их на 25 минут.

Далее измерить оптическую плотность содержимого всех 3-х пробирок в фотометре, используя кюветы на 5 мм (длина волны 490 нм). В качестве контроля использовать холостую пробу.

¹ ФХС – ферментно-хромогенная смесь.

Результат рассчитать по формуле:

$$\text{Концентрация глюкозы} = \frac{\text{Оптическая плотность пробы}}{\text{Оптическая плотность калибратора}} * 9 \quad (1)$$

2.3.6 Получение сухого материала

По окончании культивирования биомассу пропускали через фильтр вакуумного насоса (рис. 3) и сушили в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 12 часов.



Рисунок 3– Высушивание до сухого веса

Массу бактериальной целлюлозы определяли на аналитических весах 4-го класса точности.

2.3.7. Расчет продуктивности

Продуктивность рассчитывали по формуле

$$\text{Продуктивность условий} = \frac{\text{Масса БЦ}}{\text{Объем среды} * \text{количество суток}} \quad (2)$$

ВЫВОДЫ

1. Изучено влияние механического перемешивания на биосинтез БЦ. Установлено, что в условиях встряхивания в орбитальном шейкере инкубаторе максимальный выход БЦ достигается при 200 об/мин и составил 0,47 г. При перемешивании мешалкой в ферментёре максимум выхода БЦ смещается в сторону более низких оборотов и соответствует 150 об/мин 3,9 г. Более высокие обороты в ферментёре ингибировали синтез БЦ.

2. Изучены процессы синтеза БЦ в условиях подвода энергии к газовой фазе. Установлено что максимальный выход БЦ достигается при аэрации 2 л/мин и составил 0,8 г (а.с.в.). Анализ экономических коэффициентов показал, что аэрация оказывает большее влияние на биосинтез БЦ, чем перемешивание, максимальные значения экономических коэффициентов составили 0,16 и 0,11 соответственно.

3. Изучены процессы синтеза БЦ при комбинированном подводе энергии (механическое перемешивание и аэрация). Установлены параметры процесса, 50 оборотов в минуту, и уровень аэрации 2 л/мин., при которых обеспечивается максимальный выход БЦ 9,0 г.

4. Выполнена оценка продуктивности процесса синтеза БЦ при различных режимах культивирования. Установлено, что наиболее высокая продуктивность 0,019 г/л*сутки достигается при условии комбинирования двух факторов, таких как степень аэрации и количество подаваемого воздуха. Экономический коэффициент составил 0,25, что указывает на более эффективную утилизацию субстрата.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Brown A.J. On an acetic ferment which forms cellulose / A.J. Brown // J. Chem. Soc. Trans., 1886, 49.- p. 432–439.
2. Болотова К.С., Чухчин Д.Г., Майер Л.В., Гурьянова А.А. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы// Известия высших учебных заведений. Лесной журнал- 2016 - № 6- С 153-165.
3. Hassan, E. A., Abdelhady, H. M., El-Salam, S. S. A., & Abdullah, S. M. (2015). The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under optimized fermentation conditions. *British Microbiology Research Journal*, 9, 1-13.
4. Barsha J. Structure of the cellulose synthesized by the action of *Acetobacter xylinus* on fructose and glycerol / J. Barsha, H. Hibbert // *Can. J. Res.*, 1934, 10.- p.170-179.
5. Yizao Wan, Da Hu, Guangyao Xiong, Deying Li, Ruisong Guo, Honglin Luo. Directional fluid induced self-assembly of oriented bacterial cellulose nanofibers for potential biomimetic tissue engineering scaffolds// *Materials Chemistry and Physics*- 2015, № 3, с 7-11
6. Sangok Bae, Yasushi Sugano, Makoto Shoda. Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor// *Journal of Bioscience and Bioengineering*- 2004, №29, Pages 33-38
7. Акимова Р., Бенедиктов И., Соловьев М. Изучение ферментативного гидролиза жира в присутствии *Lambia duodenalis* (in vitro) // *Паразитология*. - 1978. - № XII. – С.10 42
8. Bi, J.-C., Liu, S.-X., Li, C.-F., Li, J., Liu, L.-X., Deng, J., & Yang, Y.-C. Morphology and structure characterization of bacterial celluloses produced by different train sinagitated culture. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117, 1305—1311.

9. Retegi, N. Gabilondo, C. Pena, R. Zuluaga, C. Castro, P. Ganan, K. de La Caba, I. Mondragon, Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships, *Cellulose* 17 (3) (2010) 661–669.
10. Liu G., He, Li X., Wang S., Li L., Zuo G., Huang Y., Y. Wan, Three-dimensional cuprous oxide microtube lattices with high catalytic activity templated by bacterial cellulose nanofibers, *J. Mater. Chem.* 21 (29) (2011) 10637–10640.
11. Dehui Lin, Zhe Liu, Rui Shen, Siqian Chen, Xingbin Yang, Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, №158, 2020.
12. Faezah Esa Siti, Masrinda Tasirin Norliza, Abd Rahman. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application// *Agriculture and Agricultural Science Procedia*- 2014, № 2, Pages 113-119.
13. Гладышева Е.К., Скиба Е.А.// *Ползуновский вестник*- 2014, № 3, с 168-173
14. Barud H.G.D., R.R. da Silva, Barud H.D., Tercjak A., J. Gutierrez, W.R. Lustri, O.B. de Oliveira, S.J.L. Ribeiro, A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: bacterial cellulose, *Carbohydr. Polym.* 153 (2016) 406–420.
15. Barnhart D.M., Su S., Baccaro B.E., Banta L.M., Farrand S.K., CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of *caulobacter*, regulates cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 7188–7202.
16. Matthyse A.G., Marry M., Krall L., Kaye M., Ramey B.E., Fuqua C., A.R. White, The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18 (2005) 1002–1010.
17. Ude S., Arnold D.L., Moon C.D., Timms-Wilson T., Spiers A.J., Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates, *Environ. Microbiol.* 8 (2006) 1997–2011.

18. Robledo M., Rivera L., Jimenez-Zurdo J.I., Rivas R., Dazzo F., Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces, *Microb. Cell Fact.* 11 (2012) 125.
19. Yang Y., Jia J., J. Xing, Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* CIs26, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 2012–2017.
20. Ullah M.W., Ul-Islam M., Khan S., Kim Y., Park J.K., Structural and physicomechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 908–916.
21. Buldum G., Bismarck A., Mantalaris A., Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli*, *Biopro. Biosyst. Eng.* 41 (2018) 265–279.
22. Fang J., Kawano S., Tajima K., Kondo T., In vivo curdlan/cellulose bionanocomposite synthesis by genetically modified *Gluconacetobacter xylinus*, *Biomacromol.* 16 (2015) 3154–3160.
23. Wu R.Q., Li Z.X., Yang J.P., Xing X.H., Shao D.Y., Xing K.L., Mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment: a useful method to improve the bacterial cellulose yield of a *Gluconoacetobacter xylinus* strain, *Cellulose* 17 (2) (2010) 399–405.
24. Hungund B.S., Gupta S.G., Strain improvement of *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526 for bacterial cellulose production, *Afr. J. Biotechnol.* 9 (32) (2010) 5170–5172.
25. Hornung M., Ludwig M., Schmauder H.-P. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: A Novel Aerosol Bioreactor Working on a Fed Batch Principle// 1 Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie e.V. (fzmb), Bad Langensalza, Germany- 2007, № 1, c 35-41
26. Sulaeva I., Henniges U., Rosenau T., Potthast A.. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review// *Biotechnology Advances*- 2015, № 33, C 1547-1571

27. Lina Fua, Jin Zhanga, Guang Yanga. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair// Carbohydrate Polymers-2015, № 92, 1442-1697.
28. Бахман М., Петрухин И.Ю., Бутенко И.Е., Дутка К.В., Громовых П.С. Биосинтез бактериальной целлюлозы продуцентом *Gluconacetobacter hansenii* в глубоинной культуре// Евразийское научное объединение- 2017, № 2, с 1-5
29. Gromovykh T. I., Pigaleva M. A., Gallyamov M. O., Ivanenko I. P., Ozerova K. E., Kharitonova E. P., Marjan Bahman, Nataliya B. Feldman, Sergey V. Lutsenko, Olga I. Kiselyova. Structural organization of bacterial cellulose: the origin of anisotropy and layered structures//Carbohydrate Polymers-2020, №237.
30. Vinod Kumar, Devendra Kumar Sharma, Vasudha Bansal, Deepak Mehta, Rajender S Sangwan, Sudesh Kumar Yadav. Efficient and economic process for the production of bacterial cellulose from isolated strain of *Acetobacter pasteurianus* of RSV-4 bacterium// Bioresource Technology-2019, №275, 430-433.
31. An, S.-J., Lee, S.-H., Huh, J.-B., Jeong, S.I., Park, J.-S., Gwon, H.J., Kang, E.-S., Jeong, Ch.-M., & Lim, Y.-M. (2017). Preparation and characterization of resorbable bacterial cellulose membranes treated by electron beam irradiation for guided bone regeneration. International Journal of Molecular Science, 18, 2236-2254.
32. Cazóna P., Velázquezb G., Vázquez M., Bacterial cellulose films: Evaluation of the water interaction. Food Packaging and Shelf Life, №25, 2020.
33. Petersen N., Gatenholm P., Bacterial cellulose-based materials and medical devices:current state and perspectives, Appl. Microbiol. Biotechnol. 91 (5) (2011) 1277–1286.
34. Campano C., Balea A., Blanco A., Negro C., Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review, Cellulose 23 (1) (2016) 57–91.
35. Pa'e N., Rotary Discs Reactor for Enhanced Production of Microbial Cellulose, Universiti Teknologi Malaysia, Faculty of Chemical and Natural Resource Engineerin O, 2009.

36. Kouda T., Yano H., Yoshinaga F., Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture, *J. Ferment. Bioeng.* 83 (4) (1997) 371–376.
37. Keshk S.M., Bacterial cellulose production and its industrial applications, *Bioprocessing & Biotechniques* 4 (2) (2014) 1–10.
38. Cheng K.C., Demirci A., Catchmark J.M., Advances in biofilm reactors for production of value-added products, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2) (2010) 445–456.
39. Choi C.N., Song H.J., Kim M.J., Chang M.H., Kim S.J., Properties of bacterial cellulose produced in a pilot-scale spherical type bubble column bioreactor, *Korean J. Chem. Eng.* 26 (1) (2009) 136.
40. Wanga J., Tavakoli J., Tang Y., Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods, *Carbohydrate Polymers*, №219, September 2019.
41. Prudnikova S.V., Volova T.G., Shishatskaya E.I. (2014) Shtamm bakterii *Komagataeibacter xylinus* – produtsent bakterialnoi tsellulozy (A strain of bacterium *Komagataeibacter xylinus* – a producer of bacterial cellulose). RF Patent for an invention No. 2568605. Priority of 11 December 2014. Registered in the RF State Register on 27 October 2015 (in Russian)/

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

«30» июня 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Синтез бактериальной целлюлозы глубинной культурой уксуснокислых
бактерий *Komagataeibacter xylinus* B-12068 в ферментере

Руководитель

 30.06.20

к. т. н.

Е. Г. Киселев

Выпускник

Романюк, 30.06.2020

В. П. Романюк